

罗格列酮对小鼠日本血吸虫病肝纤维化基质金属蛋白酶-2的影响

谌辉, 张景辉, 刘文琪, 贺永文

■背景资料

PPAR γ 是一类由配体激活的核转录因子, 其功能改变与一些肝脏疾病有相关性。PPAR γ 与配体结合后被激活, 在肝纤维化形成中的作用已成为肝纤维化研究领域里的一个新热点。我们在以往的研究中已证实PPAR γ 配体罗格列酮有抗血吸虫病肝纤维化作用。为进一步探讨其可能的作用机制, 本实验研究罗格列酮对血吸虫病肝纤维化基质金属蛋白酶-2的影响。

谌辉, 贺永文, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科 湖北省武汉市 430030
张景辉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院外科实验室 湖北省武汉市 430030
刘文琪, 华中科技大学同济医学院寄生虫学教研室 湖北省武汉市 430022
湖北省自然科学基金, No. 2005ABA170
通讯作者: 谌辉, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科。chenhui0515@yahoo.com.cn
电话: 027-85726132
收稿日期: 2007-03-23 接受日期: 2007-05-11

Effects of rosiglitazone on matrix metalloproteinase-2 in mice with schistosomiasis and liver fibrosis

Hui Chen, Jing-Hui Zhang, Wen-Qi Liu, Yong-Wen He

Hui Chen, Yong-Wen He, Department of Infectious Disease, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Jing-Hui Zhang, Department of Surgical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Wen-Qi Liu, Department of Parasitology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: The Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2005ABA170

Correspondence to: Hui Chen, Department of Infectious Disease, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. chenhui0515@yahoo.com.cn

Received: 2007-03-23 Accepted: 2007-05-11

Abstract

AIM: To study the effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activator receptor (gamma) ligand, on serum levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2), along with the hepatic expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNA in mice with liver fibrosis caused by *Schistosoma japonicum* infection.

METHODS: Fifty mice were divided into five groups: one uninfected group (A), and four

schistosomiasis groups (B-E): without any treatment (B), praziquantel treatment (C), rosiglitazone treatment (D), and rosiglitazone and praziquantel treatment (E). Serum levels of MMP-2 and TIMP-2 were measured by ELISA. Hepatic expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNA were determined by real-time quantitative PCR.

RESULTS: Serum level and hepatic mRNA expression of MMP-2 were markedly higher in groups D and E [306.0 ± 62.3 $\mu\text{g/L}$, 312.0 ± 54.3 $\mu\text{g/L}$; $-19.123 \pm (-5.965)$, $-20.375 \pm (-6.189)$] than in group A [221.3 ± 39.2 $\mu\text{g/L}$, $-26.324 \pm (-5.314)$; $P < 0.05$], but were lower than in group B [411.3 ± 57.5 $\mu\text{g/L}$, $-12.227 \pm (-4.426)$, $P < 0.05$] and group C [402.9 ± 57.2 $\mu\text{g/L}$, $-12.804 \pm (-4.036)$, $P < 0.05$]. Serum level and hepatic mRNA expression of TIMP-2 was markedly increased in the four schistosomiasis groups compared to the normal group [209.3 ± 60.5 $\mu\text{g/L}$, $-20.516 \pm (-4.716)$; 213.5 ± 66.0 $\mu\text{g/L}$, $-19.944 \pm (-5.052)$; 223.6 ± 65.3 $\mu\text{g/L}$, $-18.767 \pm (-5.509)$; 224.5 ± 64.4 $\mu\text{g/L}$, $-19.676 \pm (-4.320)$ vs 150.4 ± 46.5 $\mu\text{g/L}$, $-27.186 \pm (-5.985)$, $P < 0.05$]; however, there was no significant difference among the schistosomiasis groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: MMP-2 plays a role in promoting liver fibrosis. Rosiglitazone can relieve liver fibrosis because it down-regulates the expression of MMP-2 in mice with schistosomiasis and liver fibrosis.

Key Words: Peroxisome proliferator-activator receptor gamma; Fibrosis; Matrix metalloproteinase-2; Tissue inhibitor of metalloproteinase-2

Chen H, Zhang JH, Liu WQ, He YW. Effects of rosiglitazone on matrix metalloproteinase-2 in mice with schistosomiasis and liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(18):2046-2049

摘要

目的: 研究PPAR γ 配体罗格列酮治疗小鼠血吸虫病肝纤维化, 血清MMP-2与TIMP-2的变化

及肝组织MMP-2与TIMP-2的基因表达。

方法: 昆明小鼠50只, 随机分为正常对照组A、感染对照组B、吡喹酮治疗组C、罗格列酮治疗组D及罗格列酮加吡喹酮治疗组E。除正常对照组外, 其余各组均建立血吸虫病肝纤维化小鼠模型。用ELISA法检测血清MMP-2及TIMP-2的含量, 实时荧光定量PCR反应观察小鼠肝组织MMP-2 mRNA及TIMP-2 mRNA的表达。

结果: D、E组血清MMP-2的含量($306.0 \pm 62.3 \mu\text{g/L}$, $312.0 \pm 54.3 \mu\text{g/L}$)及肝组织MMP-2 mRNA的表达[$-19.123 \pm (-5.965)$, $-20.375 \pm (-6.189)$]高于A组[$221.3 \pm 39.2 \mu\text{g/L}$, $-26.324 \pm (-5.314)$; $P < 0.05$], 但明显低于B组[$411.3 \pm 57.5 \mu\text{g/L}$, $-12.227 \pm (-4.426)$, $P < 0.05$]和C组[$402.9 \pm 57.2 \mu\text{g/L}$, $-12.804 \pm (-4.036)$, $P < 0.05$]。B、C、D和E组血清TIMP-2的含量及肝组织TIMP-2 mRNA的表达均显著高于正常对照组[$209.3 \pm 60.5 \mu\text{g/L}$, $-20.516 \pm (-4.716)$; $213.5 \pm 66.0 \mu\text{g/L}$, $-19.944 \pm (-5.052)$; $223.6 \pm 65.3 \mu\text{g/L}$, $-18.767 \pm (-5.509)$; $224.5 \pm 64.4 \mu\text{g/L}$, $-19.676 \pm (-4.320)$ vs $150.4 \pm 46.5 \mu\text{g/L}$, $-27.186 \pm (-5.985)$, $P < 0.05$], 但这4组间TIMP-2值无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: MMP-2在血吸虫病肝纤维化形成中起促进作用, PPAR γ 配体罗格列酮的抗肝纤维化机制与其下调MMP-2的表达有一定关系。

关键词: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 肝纤维化; MMP-2; TIMP-2

湛辉, 张景辉, 刘文琪, 贺永文. 罗格列酮对小鼠日本血吸虫病肝纤维化基质金属蛋白酶-2的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2046-2049
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2046.asp>

0 引言

在肝纤维化形成过程中, 基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 的表达与活性增高^[1]。激活的MMP-2因能降解肝窦隙内皮下正常基底膜基质而促使肝星状细胞(HSC)活化。因而在肝纤维化的形成过程中起促进作用。有文献报道过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators activator receptors gamma, PPAR γ)的配体, 有较好的抗肝纤维化作用^[2]。我们以往的研究也证实了这一点^[3]。但其具体机制尚不完全清楚, 我们研究PPAR γ 配体罗格

列酮治疗小鼠血吸虫病肝纤维化, 血清MMP-2与基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)的变化及肝组织MMP-2与TIMP-2的基因表达, 探讨PPAR γ 配体抗血吸虫病肝纤维化的可能作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明小鼠50只, 体质量16-22 g, 购于华中科技大学同济医学院动物实验中心。随机分为5组, 每组10只, 除正常对照组外, 模型组均经皮感染日本血吸虫尾蚴40条。罗格列酮片为葛兰素史克有限公司产品。MMP-2及TIMP-2引物购自上海博亚生物技术有限公司, SYBR Green I 荧光染料购自美国Biotium公司, TRIzol溶液购自美国Gibco公司。PCR仪: 上海枫岭生物技术有限公司生产的FTC-2000型实时荧光定量PCR仪。

1.2 方法 正常对照组: 常规喂养4 wk后灌服等量的生理盐水至10 wk末; 感染对照组: 感染尾蚴4 wk后灌服等量的生理盐水至10 wk末; 吡喹酮治疗组: 感染尾蚴4 wk后每天用吡喹酮500 mg/kg灌胃, 杀虫治疗2 d后改为等量的生理盐水灌胃治疗至10 wk末; 罗格列酮治疗组: 感染尾蚴4 wk后用每天罗格列酮4 mg/kg灌胃治疗至10 wk末; 罗格列酮加吡喹酮治疗组: 感染尾蚴4 wk后用吡喹酮灌胃(剂量同前)治疗2 d, 每天用罗格列酮4 mg/kg灌胃治疗至10 wk末。最后断颈法处死小鼠, 取血清置于-20℃冰箱中保存待检, 取部分肝组织置液氮中保存备检。

1.2.1 血清MMP-2及TIMP-2检测 采用ELISA方法, MMP-2及TIMP-2诊断试剂盒为美国R&D Systems公司产品。

1.2.2 肝组织MMP-2及TIMP-2表达 每份标本取组织100 mg加入玻璃匀浆器中, 加入TRIzol溶液1 mL提取总RNA, 以总RNA为模板, 逆转录合成cDNA。应用SYBR Green I 荧光染料技术行实时定量PCR反应, 以适量cDNA为模板, 以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照, PCR扩增MMP-2 mRNA及TIMP-2 mRNA基因片段。MMP-2引物设计: MMP-2引物: 上游: 5'-TGGGTGGAAATTCAGAAGGTGC-3', 下游: 5'-ATCTACTTGCTGGACATCAGGGGG-3'。TIMP-2引物: 上游: 5'-GAGATCAAGCAGATAAAGATG-3', 下游: 5'-GACCCAGTCCATCCAGAGGC-3'。GAPDH引物: 上游: 5'-GAGCTCACCGGGTTG

■创新盘点

目前国内外尚未见PPAR γ 配体与血吸虫病肝纤维化的关系进行研究。本文首次研究PPAR γ 配体对小鼠日本血吸虫病肝纤维化MMP-2及TIMP-2的影响。

■应用要点

本实验显示PPAR γ 配体罗格列酮能下调日本血吸虫病肝纤维化MMP-2的表达,为PPAR γ 配体与血吸虫病肝纤维化的关系提供新的依据。

表 1 小鼠MMP-2和TIMP-2含量和MMP-2和TIMP-2 mRNA的表达(mean \pm SD, $n = 10$)

分组	血清(μ g/L)		肝组织	
	MMP-2	TIMP-2	MMP-2 mRNA	TIMP-2 mRNA
正常对照	221.3 \pm 39.2	150.4 \pm 46.5	-26.3 \pm (-5.3)	-27.2 \pm (-6.0)
感染对照	411.3 \pm 57.5 ^a	209.3 \pm 60.5 ^a	-12.2 \pm (-4.4) ^a	-20.5 \pm (-4.7) ^a
吡喹酮	402.9 \pm 57.2 ^a	213.5 \pm 66.0 ^a	-12.8 \pm (-4.0) ^a	-19.9 \pm (-5.1) ^a
罗格列酮	306.0 \pm 62.3 ^{ac}	223.6 \pm 65.3 ^a	-19.1 \pm (-6.0) ^{ac}	-18.8 \pm (-5.5) ^a
罗格列酮加吡喹酮	312.0 \pm 54.3 ^{ac}	224.5 \pm 64.4 ^a	-20.4 \pm (-6.2) ^{ac}	-19.7 \pm (-4.3) ^a

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 感染对照组和吡喹酮组。

GTTTTG-3', 下游: 5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'。PCR反应参数: 预变性94 $^{\circ}$ C 5 min, 然后94 $^{\circ}$ C变性30 s, 53 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共30个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。在延伸的过程中搜集荧光信号。于每次扩增的同时设置无cDNA的阴性对照, 将PCR产物做熔解曲线, 65 $^{\circ}$ C Touch-Down PCR, 每个循环温度上升0.2 $^{\circ}$ C, 150个循环, 证实以上PCR反应产物特异性良好。计算方法: 待测样品相对值 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ 待测样品 - ΔCt β -actin; $Ct = Ct$ 阴性对照 - Ct 待测样品。统计 $\Delta\Delta Ct$ 值以比较各组MMP-2 mRNA及TIMP-2 mRNA的表达。

统计学处理 采用SPSS11.5软件分析。计量资料结果以mean \pm SD示, 采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清MMP-2和TIMP-2 感染对照组和吡喹酮治疗组血清MMP-2的含量显著高于正常对照组($P < 0.05$), 罗格列酮组及罗格列酮加吡喹酮组MMP-2的含量高于正常对照组, 但明显低于感染对照组和吡喹酮治疗组($P < 0.05$)。感染对照组, 吡喹酮治疗组, 罗格列酮组及罗格列酮加吡喹酮组血清TIMP-2的含量显著高于正常对照组($P < 0.05$), 但这4组间TIMP-2值无显著性差异($P > 0.05$)(表1)。

2.2 肝组织MMP-2 mRNA和TIMP-2 mRNA表达 感染对照组和吡喹酮治疗组肝组织MMP-2 mRNA的含量显著高于正常对照组($P < 0.05$), 罗格列酮组及罗格列酮加吡喹酮组MMP-2 mRNA的含量高于正常对照组, 但明显低于感染对照组($P < 0.05$)。感染对照组, 吡喹酮治疗组, 罗格列酮组及罗格列酮加吡喹酮组肝组织TIMP-2 mRNA的含量显著高于正常对照组($P < 0.05$)。这4组间TIMP-2 mRNA的表达无显著性差异

($P > 0.05$)(表1)。

3 讨论

肝细胞外基质(ECM)的合成与降解处于动态平衡之中, 各种病因引起肝细胞发生坏死和炎症刺激时, 导致ECM合成与降解平衡破坏, ECM合成增多和/或降解减少, 沉积在肝内引起肝纤维化^[4]。MMPs是一组蛋白酶类, 具有降解ECM作用。其活性受基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)调节^[5]。TIMPs是MMPs活性组织抑制物, TIMPs与等比例的MMPs以非共价键可逆性结合形成复合体, 从而抑制MMPs的活性。目前认为, 肝纤维化是一个可逆的动态过程, 该过程反映出ECM代谢的变化, 而MMPs和TIMPs间的平衡决定了ECM的代谢。因此, MMPs和TIMPs生成、活化及表达的变化是决定肝纤维化进展和消退的关键因素^[6-7]。

MMP-2又称IV型胶原酶, 能降解明胶和IV, V, VII, X型基底膜胶原。一旦激活, 即可降解细胞周围的基底膜成分如IV型胶原、层黏连蛋白等, 打破细胞与ECM之间正常的关系, 破坏维持HSC于静止状态所必须的基底膜样的基质环境, HSC会被激活并向成纤维细胞转化, 同时大量产生包括I, III型胶原在内的ECM, 促进肝纤维化的发生和发展^[8]。MMP-2的表达与酶活性在肝纤维化的逆转过程中是逐渐降低的, 说明MMP-2与肝纤维化的发生、发展密切相关^[9]。TIMP-2主要由肝细胞、HSC等产生, 可在原位抑制MMP-2活力, 使ECM降解减少^[10]。MMP-2和TIMP-2的动态变化是决定肝纤维化的关键因素之一。PPAR γ 是一类由配体激活的核转录因子, 是重要的肝脏代谢功能调节分子, 其功能改变与一些肝脏疾病有相关性^[11-13]。PPAR γ 及其配体在肝纤维化形成中的作用已引起人们的关注, 但其具体机制尚不完全清楚。目前认为

PPAR γ 配体作为PPAR γ 的激活剂, 可抑制肝星状细胞的增殖, 减少肝内胶原积聚和增加肝内胶原酶活性^[14]. 但其对在肝纤维化形成中起作用的MMPs是否亦可发挥作用尚不清楚.

我们用日本血吸虫尾蚴感染小鼠建立肝纤维化模型, 并检测血清及肝组织MMP-2和TIMP-2的表达, 发现感染对照组血清MMP-2的含量及肝组织MMP-2 mRNA的表达显著高于正常对照组; IMP-2的含量及表达也较正常对照组升高, 但其表达相较于MMP-2过于低下. 从而使MMP-2的活性得不到抑制而增高, 促进了肝纤维化的形成与发展. 肝纤维化时, TIMP-2表达相对或绝对下调, 而MMP-2表达增多, 结果是除间质胶原外的大部分ECM可及时降解, 这也可能是肝硬化组织和正常肝组织ECM成分存在质和量的不同及组织结构不同的原因. 在肝纤维化早期采用PPAR γ 配体罗格列酮治疗, 观察血清及肝组织MMP-2和TIMP-2的表达. 发现罗格列酮治疗后MMP-2血清含量及肝组织mRNA表达较感染对照组明显降低, 而TIMP的血清含量及肝组织mRNA表达变化不大, 提示PPAR γ 配体罗格列酮可通过下调MMP-2的水平, 减轻MMP-2对肝脏正常基底膜的破坏, 从而间接抑制了HSC的激活, 阻止肝纤维化的发展.

一般说来, MMPs是以非活性的酶原形式分泌的, 然后再在细胞外激活, 因此, MMPs可以在血循环中检测到. 由于尚未发现外周血细胞有MMP2的表达, 故认为MMP2是肝脏特异的, 亦即血循环中MMP2水平与肝内MMP2表达密切相关^[9]. 我们也发现, 血清MMP-2含量与肝组织MMP-2 mRNA表达基本一致. 本实验显示PPAR γ 配体罗格列酮的抗日本血吸虫病肝纤维化机制与其下调MMP-2的表达有一定关系.

4 参考文献

- 1 Zhou X, Hovell CJ, Pawley S, Hutchings MI, Arthur MJ, Iredale JP, Benyon RC. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int* 2004; 24: 492-501
- 2 Lv P, Luo HS, Zhou XP, Chireyath Paul S, Xiao

- YJ, Si XM, Liu SQ. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 777-788
- 3 湛辉, 张景辉, 刘文琪, 贺永文. 罗格列酮对日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织核因子- κ B和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 741-745
- 4 Kershenobich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2003; 2: 159-163
- 5 Skiles JW, Gonnella NC, Jeng AY. The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem* 2004; 11: 2911-2977
- 6 Roderfeld M, Hemmann S, Roeb E. Mechanisms of fibrinolysis in chronic liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs). *Z Gastroenterol* 2007; 45: 25-33
- 7 Xu GF, Li PT, Wang XY, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3621-3627
- 8 Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159
- 9 El-Gindy I, El Rahman AT, El-Alim MA, Zaki SS. Diagnostic potential of serum matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients with HCV related chronic liver disease. *Egypt J Immunol* 2003; 10: 27-35
- 10 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 86-90
- 11 Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, Suzuki Y, Saito H, Kohgo Y, Okumura T. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 215-222
- 12 Berkenstam A, Gustafsson JA. Nuclear receptors and their relevance to diseases related to lipid metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 171-176
- 13 Yang L, Chan CC, Kwon OS, Liu S, McGhee J, Stimpson SA, Chen LZ, Harrington WW, Symonds WT, Rockey DC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G902-911
- 14 Yuan GJ, Zhang ML, Gong ZJ. Effects of PPARg agonist pioglitazone on rat hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1047-1051

■同行评价

本文用PPAR γ 配体罗格列酮干预治疗肝纤维化动物模型, 结果显示罗格列酮抗日本血吸虫病肝纤维化机制与其下调MMP-2的表达有关. 文章设计合理, 有一定的参考价值.

电编 张敏 编辑 程剑侠